

Role membránových transportérů v chemorezistenci karcinomu pankreatu při terapii gemcitabinem

The Role of Membrane Transporters in Cellular Resistance of Pancreatic Carcinoma to Gemcitabine

Mohelníková-Duchoňová B.^{1,2}, Souček P.¹

¹Laboratoře toxikogenomiky, Státní zdravotní ústav, Praha

²I. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha

Souhrn

Východiska: Karcinom pankreatu je jednou z nejzávažnějších forem nádorového onemocnění s velmi vysokou mortalitou, která ho v ČR řadí na čtvrtou příčku v příčinách úmrtí na nádorová onemocnění. Cytostatikum ze skupiny nukleosidových analog – gemcitabin – patří v současné době mezi široce užívané preparáty v onkologické léčbě a zejména u karcinomu pankreatu. Existují však významné interindividuální rozdíly ve farmakokinetice a farmakodynamice gemcitabinu, které mohou významně ovlivnit výsledek terapie u takto léčených pacientů. Vznik lékové rezistence výrazně limituje klinické využití gemcitabinu, stejně jako ostatních cytostatik. **Cíl:** V tomto článku jsou shrnuty základní dostupné informace o významných membránových proteinech účastnících se transportu gemcitabinu přes buněčnou membránu a jejich role při vzniku chemorezistence u nádorových buněk pankreatu.

Klíčová slova

karcinom pankreatu – membránové transportní proteiny – ABC přenašeče – proteiny přenášející nukleosidy – gemcitabin

Summary

Backgrounds: Pancreatic carcinoma is one of the most serious forms of cancer, with a very high mortality rate, and is the fourth leading cause of cancer-related death in the Czech Republic. The etiology and molecular pathogenesis of the disease is still poorly understood. Gemcitabine is a cytotoxic nucleoside analog, which is widely used in the treatment of malignancies, and in particular in pancreatic carcinoma. Interindividual differences in gemcitabine pharmacokinetics and pharmacodynamics have been demonstrated, which can significantly influence the outcome of the therapy in thus treated patients. Resistance developed to nucleoside analogs limits their clinical use, just like in the case of any other cytostatics. **Aim:** This review summarizes available data concerning the membrane proteins involved in the transport mechanism of gemcitabine through cellular membrane, and their role in the cellular resistance of pancreatic carcinoma to gemcitabine.

Key words

pancreatic cancer – membrane transport proteins – ATP-binding cassette transporters – nucleoside transport proteins – gemcitabine

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



MUDr. Beatrice
Mohelníková-Duchoňová
Laboratoře toxikogenomiky
Státní zdravotní ústav v Praze
Šrobárova 48
100 42 Praha 10
e-mail: mohelnikova@szu.cz

Obdrženo/Submitted: 22. 3. 2010
Přijato/Accepted: 10. 6. 2010

Úvod

Karcinom pankreatu (MKN-10 : C.25; OMIM : 260350) je jednou z nejzávažnějších forem nádorového onemocnění s velmi vysokou mortalitou, která ho v ČR řadí na čtvrtou příčku v příčinách úmrtí na nádorová onemocnění (zdroj ÚZIS 2010, www.novis.cz). Etiologie a molekulární patogeneze tohoto onemocnění nejsou stále objasněny. Mezi publikované rizikové faktory patří věk, pohlaví, diabetes, chronická pankreatitida, dietní návyky, kouření a infekce *Helicobacter pylori* [1,2]. Navíc genetická variabilita genů kódujících enzymy metabolismu cizorodných látek může rovněž hrát důležitou roli při vzniku a rozvoji této malignity.

Mezi základní prognostické faktory patří stadium onemocnění (staging), provedení radikálního chirurgického výkonu a výkonnostní stav pacienta (performance status) [3].

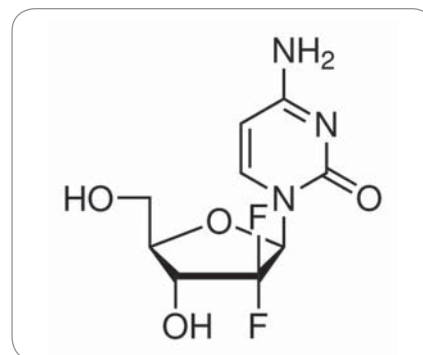
Molekulárně biologické prognostické faktory jsou intenzivně studovány, ale zatím bez uplatnění v klinické praxi [4].

Mutace v genu *KRAS* jsou přítomny přibližně v 85 % sporadických nádorů pankreatu [4]. Frekvence výskytu *KRAS* mutací jsou asociovány s kouřením, alkoholem a expozicí organickým rozpouštědly [5,6]. Tyto mutace lze detekovat již na samém počátku nádorového procesu [7]. Mutace v kodonu 12 působí změnu funkce *KRAS* proteinu, který setrvává v aktivovaném stavu, a umožňuje tak funkci signálních drah (MAPK, PI3K, NF- κ B a RAL-GTP), což vede k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi a následné kumulaci pozdějších alterací v dalších genech, jako *CDKN2A*, *TP53* apod. [8]. Studie s využitím inhibice exprese pomocí siRNA poukázaly na zásadní úlohu *KRAS* při udržení nádorové populace [9,10]. *KRAS*-negativní tumory vykazují, co se týče přežívání pacientů po radioterapii, lepší výsledky než tumory s přítomnými mutacemi. Analýzou podtypů *KRAS* mutací u karcinomu pankreatu bylo v souladu s výše zmíněnou studií prokázáno, že na výsledné přežívání nemocných mají vliv zejména mutace cGT, GcT a GaT v kodonu 12 (wild type GGT) [11]. Tumory s mutacemi v kodonu 13 mají menší tendenci k lokální progresi i ke vzdálenému metastazování [12].

Prognóza tohoto onemocnění je vzhledem k mortalitě rovnající se incidenci infaustní. Chemoterapií pokročilého karcinomu pankreatu je dosahováno mediánu přežití jen kolem 5–8 měsíců. V kontrolních skupinách bez chemoterapie se pohybuje medián přežití pouze mezi 2 a 4 měsíci [3]. Jednou z příčin pozdní diagnostiky tohoto typu onemocnění. Klinické příznaky se objevují až v pozdních stadiích a v době diagnózy je již 50 % pacientů s metastatickým postižením. Jediným dnes potenciálně kurativním přístupem je radikální resekce. S ohledem na pozdní diagnózu a špatný výkonnostní stav nemocných podstupuje radikální výkon jen kolem 15–20 % pacientů [13]. V adjuvanci i paliativní chemoterapii se uplatňují zejména nukleotidové antimetabolity. Dnes je uváděn jako lék první volby gemcitabin (2',2'-difluordeoxycytidin).

Gemcitabin

Gemcitabin – 2',2'-difluordeoxycytidin (obr. 1) patří ke druhé generaci nukleosidových analogů. K léčbě karcinomu pankreatu je standardně používán preparát Gemzar, který je využíván i při léčbě NSCLC a karcinomu močového měchýře, v druhé linii i pro nádory ovaria a prsu. Přestože je monoterapie gemcitabinem uváděna jako zlatý standard v léčbě pokročilého adenokarcinomu pankreatu (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Pancreatic Adenocarcinoma V.1.2009. National Comprehensive Cancer Network), je odpověď na terapii gemcitabinem u nádorových buněk pankreatického duktálního adenokarcinomu v některých studiích uváděna jen 12 % a výsledky léčby mezi jednotlivými pacienty se významně liší. V současnosti je vyvíjena maximální snaha o nalezení prediktivních faktorů odpovědi na léčbu gemcitabinem u pacientů s karcinomem pankreatu a individualizaci léčby. Matsubara et al [14] vytvořili skórovací systém (normogram), který v jejich kohortě 304 pacientů s pokročilým karcinomem pankreatu léčených gemcitabinem dokázal rozlišit vysoce rizikovou skupinu pacientů s krátkým mediánem přežívání do 150 dní ($p = 2 \times 10^{-15}$). Sledovanými parametry tohoto normogramu byly hladiny α 1-antitrypsinu a al-



Obr. 1. Gemcitabin.

kalické fosfatázy v plazmě pacientů, počet leukocytů a performance status.

Chemorezistence je způsobena mnoha různými, pravděpodobně na sobě nezávislými mechanismy. Gemcitabin je transportován do intracelulárního prostoru pomocí nukleosidových transportérů [3], naopak transportéry rodiny ABC způsobují jeho eflux ven z buňky [4]. Intracelulárně dochází k jeho metabolické aktivaci. Preparát je fosforylován deoxycytosinkinázou na gemcitabin-monofosfát a dále konvertován na dFd-dCDP a dFd-dCTP. Vzniklé metabolity gemcitabin-trifosfát a gemcitabin-difosfát [15] zodpovídají za vlastní cytostatický efekt léku.

Na fosforylaci gemcitabinu se může podílet i mitochondriální tymidinkináza (TK2). Substrátová specifita TK2 je však pro gemcitabin výrazně nižší než pro přírodní formy nukleosidů.

Metabolická inaktivace probíhá zejména cestou cytidindeaminázy anebo po fosforylaci cestou deoxycytidindeaminázy (DCTD) [16]. DCTD se účastní reakce, při které vzniká 2'-2' difluordeoxyuridin. Mezi dalšími faktory, které velmi pravděpodobně ovlivňují citlivost, jsou zvýšená oprava DNA a alterace cesty apoptózy [17]. V poslední době je věnováno velké úsilí studiu možností ovlivnění cest buněčné signalizace a úloze genů regulujících buněčný cyklus.

Nukleosidové transportéry

Přestože gemcitabin je hydrofilní látka, pravděpodobně nedochází k jeho významnému průniku přes plazmatickou membránu prostou difúzí. Nukleosidový transport se vyskytuje jako Na^+ -independentní, obousměrný prováděný hENT (human Equilibrative Nucleoside Trans-

porter, označovaný také jako rodina SLC29), nebo jako Na⁺-dependentní, prováděný hCNT (human Concentrative Nucleoside Transporter, rodina SLC28). Zatím je známo sedm nukleosidových transportérů, které se dělí do dvou rodin proteinů: SLC29 (SLC29A2, SLC29A3, SLC29A4, známé rovněž jako hENT1, hENT2, hENT3 a hENT4) a SLC28 (SLC28A1, SLC28A2, SLC28A3, také označovány jako hCNT1, hCNT2 a hCNT3) [18,19].

Současný výzkum prokázal, že buňky, které nejsou schopny transportu pomocí těchto proteinů, jsou k inhibici gemcitabinem významně rezistentní. Příkladem je např. inhibice nukleosidových transportérů inhibitory typu dipyridamolu [20].

Gemcitabin je podáván jako i.v. bolus v infuzi trvající cca 30 min, a to první, osmý a patnáctý den 28denního cyklu, nebo jednou týdně po dobu dvou měsíců. Peak v séru dosahuje maximálně 50mM a deaminace způsobí rychlý pokles plazmatické koncentrace, takže v průběhu 2 hod spadne pod hranici stanovitelnosti. Předpoklad, který z toho vyplývá, je, že buňky jsou vystaveny gemcitabinu v signifikantní koncentraci jen krátkou dobu a neúčinný buněčný uptake je s největší pravděpodobností jedním z mechanismů chemorezistence [20].

Gemcitabinový uptake je zajišťován 4 transportéry: hENT1 \cong hCNT1 > hENT2 > hCNT3 [20]. Ve tkáních pankreatu je exprimován hENT1, hENT2 [19], ale vyskytují se zde i hCNT transportéry (hCNT1, hCNT2, hCNT3), jejichž exprese v nádorových tkáních je velmi variabilní [20]. Hlavní mechanismus příjmu gemcitabinu buňkou je tedy pravděpodobně zajišťován hENT transportéry, protože aktivita hCNT1 byla demonstrována pouze v ledvinách, játrech, střevu a hCNT3 jen v leukemických buňkách a v buňkách kolorektálního karcinomu [22].

Studie *in vitro* ukázaly, že gemcitabin je do buněk transportován převážně díky hENT1 transportéru [21] a použití inhibitorů, jako je nitrobenzyl-merkaptopurin-ribosid či dipyridamol, snížilo více než 20násobně citlivost ke gemcitabinu [20]. Imunohistochemická studie na nádorových tkáních od 21 pacientů s pokročilým karcinomem pankreatu ukázala, že pacienti s expresí hENT1 měli významně

delší medián přežití než ti s nízkou expresí či absencí hENT1 (13 vs 4 měsíce, $p = 0,01$) [23]. Podobné výsledky ukazuje i farmakogenetická studie na 83 pacientech, kdy byla exprese analyzována pomocí PCR. Dle autorů bylo celkové přežívání delší u pacientů s vysokou hladinou transkriptů hENT1 (25,7 vs 8,5 měsíce) [24].

ABC transportéry

Chemorezistence je způsobena mnoha různými, pravděpodobně na sobě nezávislými mechanismy. Jedním z důležitých mechanismů je snížená akumulace léčiva v nádorových buňkách způsobená jeho zvýšeným únikem (eflux). Ten je zprostředkován proteiny, které z velké části přísluší k nadrodině ABC transportérů (human ATP-binding cassette transporters). K dnešnímu datu bylo v lidském genomu identifikováno 49 různých ABC transportérů. Dělí se do 7 tříd (A-G) na základě sekvenční podobnosti. Prvním popsaným lidským ABC transportérem byl P-glykoprotein (ABCB1) [25]. Následně byl izolován z buněk buněčné linie bronchogenního karcinomu MRP1 (ABCC1) [26]. Ukázalo se, že zejména zástupci rodiny ABCB, ke které se řadí i P-glykoprotein [22] a rodiny ABCC [27], jsou zodpovědné za mnohočetnou lékovou rezistenci, tzv. MDR (multiple drug resistance). Kromě uvedených transportérů lze jmenovat i další transportéry, např. BCRP (ABCG2) [28].

ABCB1 (MDR1, P-glykoprotein)

ABCB1, nazývaný také MDR1 či P-glykoprotein, je nejdéle známý a v současnosti nejlépe prostudovaný zástupce ABC transportérů. Substrátem ABCB1 jsou obecně hydrofobní léky s polyaromatickým jádrem a neutrálním nebo kladným nábojem, např. etoposid, adriamycin, vinblastin [29]. Dříve provedené studie prokázaly, že genetické polymorfizmy v *ABCB1* genu jsou důležitou determinantou jeho exprese a funkce [30] a obecně ovlivňují odpověď na farmakoterapii [31]. Dle závěrů japonských studií [32,33] vykazují haplotypy *ABCB1* významnější vztah k míře exprese než jednotlivé polymorfizmy. Proto lze předpokládat, že haplotypy mohou lépe určit vztah mezi genotypem a fenotypem tohoto trans-

portéru a velmi pravděpodobně bude tento princip univerzální. Vysoce pozitivní imunohistochemické barvení pro P-glykoprotein bylo nalezeno u 73 % duktálních adenokarcinomů pankreatu ($n = 103$), přičemž exprese *ABCB1* genu byla detekována ve všech vyšetřených tumorech, a to ve zvýšené míře oproti normální tkáni slinivky břišní. Vyšší míra exprese *ABCB1* dle autorů významně korelovala s lepší prognózou a byla uvedena do souvislosti s menší biologickou agresivitou nádoru. Dále byla nalezena vyšší exprese *ABCB1* v dobře diferencovaných nádorech oproti těm hůře diferencovaným [34]. Na tuto studii navázala skupina autorů [35], v jejichž studii bylo 75 % vzorků karcinomu pankreatu imunohistochemicky pozitivních na přítomnost proteinu ABCB1 ($n = 63$). Pacienti s nízkou či střední expresí proteinu vykazovali delší dobu přežití než pacienti s negativní expresí. Velmi zajímavé bylo, že u případů s vysokým stupněm exprese genu *ABCB1* bylo nalezeno kratší přežívání než u těch s nižší expresí [35]. Exprese *ABCB1* se tedy projevuje jako obecný fenomén vyskytující se v nenádorové i nádorové tkáni, jehož klinický dopad není stále jasný, a jeví se jako aktuální pro podrobné studium v jednotlivých typech nádorů. Na našem pracovišti již probíhá studium *ABCB1* v nádorové tkáni prsu. Mezi první publikované výsledky patří prokázaný vztah mezi jednotlivými polymorfizmy genu *ABCB1* a mírou exprese tohoto genu (resp. hladinou transkriptu v nádorech prsu). Výskyt funkčních polymorfizmů navíc koreloval s prognózou onemocnění (stav estrogenních receptorů) [36].

ABCC (MRP) rodina

ABCC rodina zahrnuje 13 členů, přičemž 9 z nich se řadí mezi tzv. multidrug resistance proteins (MRP1-MRP9, resp. ABCC1-ABCC6 a ABCC10-ABCC12). ABCC transportéry jsou integrální membránové proteiny způsobující ATP-dependentní export organických iontů ven z buněk. ABCC1-6 transportují lipofilní složky konjugované s glutathionem, glukuronátem či sulfátem. Substráty pro ABCC4, ABCC5 a ABCC11 zahrnují také cyklické nukleotidy a nukleotidová analoga [37–39]. ABCC4 byl navíc iden-

Tab. 1. Známé údaje o expresi a účincích ABCB1, ABCG2 a ABCC rodiny u nádorů pankreatu.

Gen	Protein	OMIM	Lokus	Vztah k rezistenci/citlivosti ke skupině léčiv – nukleotidová analoga	Přítomnost ve zdravé tkáni pankreatu	Přítomnost ve tkáni karcinomu pankreatu	Reference
ABCB1	MDR1	171050	7q21	zvýšení citlivosti	ano	ano	41,35,34
ABCC1	MRP1	158343	16p13	zvýšení citlivosti	ano	ano	41,40
ABCC2	MRP2	601107	10q24	neprokázán	ano	ano	40
ABCC3	MRP3	604323	17q22	neprokázán	ano	ano	40
ABCC4	MRP4	605250	13q32	navození rezistence	ano	ano	51,40,37
ABCC5	MRP5	605251	3q27	navození rezistence	ano	ano	40,42,37
ABCC6	MRP6	603234	16p13	neznámý	ano	ano	40
ABCC10	MRP7	není	6p12	neznámý	ano	ano	40
ABCC11	MRP8	607040	16q12	navození rezistence	ne	ne	50,40
ABCC12	MRP9	607041	16q12	neznámý	ano	ne	40
ABCG2	BCRP	603756	4q22	jsou substrátem	ano	ano	47,52,40,28

tifikován jako kotransportér pro redukováný glutathion se žlučovými solemi a transportér prostaglandinů a DHEAS (dihydroepiandrosteron-3-sulfát).

Ve zdravé tkáni pankreatu i v ductálním adenokarcinomu jsou exprimovány geny *ABCC1-6* a *ABCC10*, zatímco gen *ABCC12* (kódující protein MRP9) byl prozatím detekován jen v normálním parenchymu slinivky břišní. Exprese *ABCC3* proteinu je v nádorových vzorcích zvýšená a koreluje s gradíngem nádoru [40]. *In vitro* studie prokázala, že zvýšená exprese *ABCB1* a *ABCC1* způsobuje buněčný stres, jehož důsledkem je i zvýšený metabolismus gemcitabinu a zvýšená vnímavost buněk k jeho působení [22]. Oguri et al [42] prověřili expresi genu *ABCC5* na buněčných liniích NSCLC (non-small cell lung cancer) a poukázali na korelaci mezi jeho expresí a rezistencí vůči gemcitabinu. Při inkubaci s inhibitorem *ABCC5* (zaprinast) dochází ke zvýšení citlivosti buněk (tj. cytotoxicity gemcitabinu), což bylo potvrzeno i užitím siRNA.

Dosud známé údaje o expresi a účincích *ABCB1*, *ABCG2* a *ABCC* rodiny u nádorů pankreatu jsou shrnuty v tab. 1.

ABCG2 (BCRP – breast cancer resistance protein)

Podobně jako u *ABCB1* vede i v případě genu *ABCG1* jeho zvýšená exprese ke vzniku mnohočetné lékové rezistence v nádorových buňkách. *ABCG2* je polo-

vičním transportérem a k jeho správné funkci je třeba vytvoření homodimerní nebo oligomerní efluxní membránové pumpy spojením dvou anebo více proteinů [43].

Substrátem pro *ABCG2* je řada cytostatik, např. topotekan, irinotekan, metotrexát, a většina nukleosidových analog včetně gemcitabinu [44,45]. *ABCG2* je exprimován v řadě zdravých tkání včetně slinivky a jeho exprese byla detekována i v nádorových buňkách karcinomu pankreatu [40]. Zhou et al demonstrovali přítomnost tzv. side population cells v buněčné linii PANC-1. Tato buněčná linie měla výrazně vyšší expresi *ABCB1* a *ABCG2* transportérů, což může významně přispívat k její známé lékové rezistenci. Po třídní kultivaci s gemcitabinem došlo k nárůstu populace těchto buněk. Autoři usuzují, že se může jednat o kandidátní nádorové kmenové buňky, které se účastní relapsu onemocnění [46].

ABCG2 navíc vykazuje spolu s P-glykoproteinem silnou tendenci k interakcím s klinicky významnými inhibitory kináz včetně erlotinibu [47].

Erlotinib (Tarceva) inhibuje receptor typu 1 pro epidermální růstový faktor (EGFR, známý také jako HER1) mechanismem selektivní intracelulární inhibice fosforylace EGFR-asociovaných tyrozin-kináz, čímž vyvolává změnu proliferační aktivity buněk.

Erlotinib je aktivně transportován do buněk pomocí *ABCB1* a *ABCG2* transportérů *in vitro* [48]. V souladu s tímto tvrzením byla i *in vivo* nalezena vyšší biologická dostupnost erlotinibu po perorálním podání u myši, které měly tyto dva transportéry inaktivovány, oproti zvířatům, která měla tyto transportéry aktivní [48].

Závěr

Karcinom pankreatu patří k nádorovým onemocněním s velmi vážnou prognózou a pětiletým přežitím pod 5%, a to i přes celosvětovou snahu o hledání účinnější léčby, včetně léčby biologické. V současnosti se za neúčinnější dostupnou léčbu považuje kombinovaná terapie: gemcitabin (Gemzar) a erlotinib (Tarceva). Pacienti s pokročilým karcinomem pankreatu léčení touto kombinací dosahují jednoletého přežití až ve 20% [49].

Chemorezistence je způsobena mnoha různými, pravděpodobně na sobě nezávislými mechanismy. Nicméně jak u gemcitabinu, tak i u erlotinibu byl *in vitro* i *in vivo* prokázán významný vliv membránových transportérů na biologickou dostupnost a účinnost těchto preparátů.

Gemcitabin je transportován do intracelulárního prostoru pomocí nukleosidových transportérů. Transportéry rodiny ABC pak způsobují vypumpování jak gemcitabinu, tak i erlotinibu ven z buňky.

Genetické alterace v genech, které kódují transportéry, mohou být u pacientů s karcinomem pankreatu jedním z potenciálních prediktivních faktorů pro individualizovanou chemoterapii.

Literatura

1. Everhart J, Wright D. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *JAMA* 1995; 273(20): 1605–1609.
2. Mukesh V. Pancreatic cancer epidemiology. *Technol Cancer Res Treat* 2005; 4: 295–301.
3. Klener P et al. *Klinická onkologie*. Praha: Galén 2002: 429–433.
4. Almoguera C, Shibata D, Forrester K et al. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988; 53(4): 49–54.
5. Li D, Xie K, Wolff R et al. Pancreatic cancer. *Lancet* 2004; 363(9414): 1049–1057.
6. Porta M, Malats N, Jarid M et al. Serum concentrations of organochlorine compounds and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. PANKRAS II Study Group. *Lancet* 1999; 354(9196): 2125–2129.
7. Terhune PG, Phifer DM, Tosteson TDet al. K-ras mutation in focal proliferative lesions of human pancreas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7(6): 515–521.
8. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME et al. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997; 88(5): 593–602.
9. Hirano T, Shino Y, Saito T et al. Dominant negative MEKK1 inhibits survival of pancreatic cancer cells. *Oncogene* 2002; 21(38): 5923–5928.
10. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; 296(5567): 550–553.
11. Kawesha A, Ghaneh P, Skar R et al. K-ras oncogene subtype mutations are associated with survival but not expression of p53, p16(INK4A), p21(WAF-1), cyclin D1, erbB-2 and erbB-3 in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2000; 89(6): 469–474.
12. Finkelstein SD, Przygodzki R, Pricolo VE et al. Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. Biologic behavior correlates with K-ras-2 mutation type. *Cancer* 1993; 71(12): 3827–3888.
13. Pannala R, Basu A, Petersen GM et al. New-onset diabetes: a potential clue to the early diagnosis of pancreatic cancer. *Lancet Oncol* 2009; 10(1): 88–95.
14. Matsubara J, Ono M, Honda K et al. Survival prediction for pancreatic cancer patients receiving gemcitabine treatment. *Mol Cell Proteomics* 2010; 9(4): 695–704.
15. Heinemann V, Hertel LW, Grindley GB et al. Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'-difluorodeoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res* 1988; 48(14): 4024–4031.
16. Plunkett W, Huang P, Xu YZ et al. Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential. *Semin Oncol* 1995; 22: 3–10.
17. Erkan M, Kleeff J, Esposito I et al. Loss of BNIP3 expression is a late event in pancreatic cancer contributing to chemoresistance and worsened prognosis. *Oncogene* 2005; 24(27): 4421–4432.
18. Baldwin SA, Beal PR, Yao SY et al. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch* 2004; 447: 735–743.
19. Gray JH, Owen RP, Giacomini KM. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch* 2004; 447(5): 728–734.
20. Mackey JR, Mani RS, Selner M et al. Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res* 1998; 58(19): 4349–4357.
21. García-Manteiga J, Molina-Arcas M, Casado FJ et al. Nucleoside transporter profiles in human pancreatic cancer cells: role of hCNT1 in 2',2'-difluorodeoxycytidine-induced cytotoxicity. *Clin Can Res* 2003; 9(13): 5000–5008.
22. Bergman AM, Pinedo HM, Talianidis I et al. Increased sensitivity to gemcitabine of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein-overexpressing human cancer cell lines. *Br J Cancer* 2003; 88(12): 1963–1970.
23. Spratlin J, Sangha R, Glubrecht D et al. The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with reduced survival in patients with gemcitabine-treated pancreas adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10(20): 6956–6961.
24. Giovannetti E, Del Tacca M, Mey V et al. Transcription analysis of human equilibrative nucleoside transporter-1 predicts survival in pancreas cancer patients treated with gemcitabine. *Cancer Res* 2006; 66(7): 3928–3935.
25. Chen CJ, Chin JE, Ueda K et al. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 1986; 47(3): 381–389.
26. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992; 258(5088): 1650–1654.
27. Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty CH, Sauna ZE et al. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 2003; 22(47): 7468–7485.
28. Borst P, Evers R, Koel M et al. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(16): 1295–1302.
29. Olempska M, Eisenach PA, Ammerpohl O et al. Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6(1): 92–97.
30. Rabow AA, Shoemaker RH, Sausville EA et al. Mining the National Cancer Institute's tumor-screening database: identification of compounds with similar cellular activities. *J Med Chem* 2002; 45(4): 818–840.
31. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(1): 48–58.
32. Marzolini C, Paus E, Buclin T et al. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75(1): 13–33.
33. Takane H, Kobayashi D, Hirota T et al. Haplotype-oriented genetic analysis and functional assessment of promoter variants in the MDR1 (ABCB1) gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311(3): 1179–1187.
34. Taniguchi S, Mochida Y, Uchiyama T et al. Genetic polymorphism at the 5' regulatory region of multidrug resistance 1 (MDR1) and its association with interindividual variation of expression level in the colon. *Mol Cancer Ther* 2003; 2(12): 1351–1359.
35. Suwa H, Ohshio G, Shinji A et al. Immunohistochemical localization of P-glycoprotein and expression of the multidrug resistance-1 gene in human pancreatic cancer: relevance to indicator of better prognosis. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87(6): 641–649.
36. Lu Z, Kleeff J, Shrikhande S et al. Expression of the multidrug-resistance 1 (MDR1) gene and prognosis in human pancreatic cancer. *Pancreas* 2000; 21(3): 240–247.
37. Václavíková R, Nordgard SH, Alnaes GI et al. Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance gene 1 (ABCB1): effects on its expression and clinicopathological characteristics in breast cancer patients. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18(3): 263–273.
38. Reid G, Wieling P, Zelcer N et al. The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 1094–1103.
39. Chen ZS, Guo Y, Belinsky MG et al. Transport of bile acids, sulfated steroids, estradiol 17-beta-D-glucuronide, and leukotriene C4 by human multidrug resistance protein 8 (ABCC11). *Mol Cancer Ther* 2005; 6(2): 545–557.
40. Wijnholds J, Mol CA, van Deemter L et al. Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(13): 7476–7481.
41. König J, Hartel M, Nies AT et al. Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma. *Int J Cancer* 2005; 115(3): 359–367.
42. Oguri T, Achiwa H, Sato S et al. The determinants of sensitivity and acquired resistance to gemcitabine differ in non-small cell lung cancer: a role of ABCC5 in gemcitabine sensitivity. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(7): 1800–1806.
43. Kage K, Fujita T, Sugimoto Y. Role of Cys-603 in dimer/oligodimer formation of the breast cancer resistance protein BCRP/ACG2. *Cancer Sci* 2005; 96(12): 866–872.
44. de Wolf C, Jansen R, Yamaguchi H et al. Contribution of the drug transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein) to resistance against anticancer nucleosides. *Mol Cancer Ther* 2008; 7(9): 3092–3102.
45. Doyle LA, Ross DD. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 2003; 22(47): 7340–7358.
46. Zhou J, Wang CY, Liu T et al. Persistence of side population cells with high drug efflux capacity in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2008; 14(6): 925–930.
47. Shi Z, Peng XX, Kim IW et al. Erlotinib (Tarceva, OSI-774) antagonizes ATP-binding cassette subfamily B member 1 and ATP-binding cassette subfamily G member 2-mediated drug resistance. *Cancer Res* 2007; 67(22): 11012–11020.
48. Marchetti S, de Vries NA, Buckle T et al. Effect of the ATP-binding cassette drug transporters ABCB1, ABCG2, and ABCG2 on erlotinib hydrochloride (Tarceva) disposition in vitro and in vivo pharmacokinetic studies employing Bcrp1-/-/Mdr1a/1b-/- (triple-knockout) and wild-type mice. *Mol Cancer Ther* 2008; 7(8): 2280–2287.
49. Ardavanis A, Kountourakis P, Karagiannis A et al. Biweekly gemcitabine (GEM) in combination with erlotinib (ERL): an active and convenient regimen for advanced pancreatic cancer. *Anticancer Res* 2009; 29(12): 5211–5217.
50. Guo Y, Kotova E, Chen Z et al. MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine. *J Biol Chem* 2003; 278(32): 29509–29514.
51. Takenaka K, Morgan JA, Scheffer GL et al. Substrate overlap between MRP4 and Abcg2/Bcrp affects purine analogue drug cytotoxicity and tissue distribution. *Cancer Res* 2007; 67(14): 6965–6972.
52. Okazaki T, Javle M, Tanaka M et al. Single nucleotide polymorphisms of gemcitabine metabolic genes and pancreatic cancer survival and drug toxicity. *Clin Cancer Res* 2010; 16(1): 320–329.